




AG

COMPOUND OF HYDROXAMIC ACID DERIVATIVE AND HYALURONIC ACID**Publication number:** WO0244218**Publication date:** 2002-06-06**Inventor:** IKEYA HITOSHI (JP); MORIKAWA TADASHI (JP);
TAKAHASHI KOICHI (JP); OKAMACHI AKIRA (JP);
TAMURA TATSUYA (JP)**Applicant:** CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD (JP); DENKI
KAGAKU KOGYO KK (JP); IKEYA HITOSHI (JP);
MORIKAWA TADASHI (JP); TAKAHASHI KOICHI (JP);
OKAMACHI AKIRA (JP); TAMURA TATSUYA (JP)**Classification:****- international:** **A61K31/728; A61P19/02; A61P29/00; A61P43/00;**
C08B37/08; A61K31/726; A61P19/00; A61P29/00;
A61P43/00; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/08;
A61K31/728; A61P19/02; A61P29/00**- European:** C08B37/00P2F**Application number:** WO2001JP10493 20011130**Priority number(s):** JP20000363993 20001130**Also published as:** JP2004292465 (A)**Cited documents:** WO9959603
 WO0046189**Report a data error here****Abstract of WO0244218**

A compound having MMP inhibitory activity which is a compound of a hydroxamic acid derivative represented by the following general formula (1) and hyaluronic acid: (1) wherein R1 represents hydrogen, hydroxy, C1-8 alkyl, etc.; R2 represents C1-8 alkyl, etc.; R3 represents C1-8 alkyl, etc.; R4 represents hydrogen or C1-4 alkyl; R5 represents -R7-R8-R9-, where R7 represents C1-8 alkylene, R8 represents methylene, imino, oxygen, etc., and R9 represents C1-10 alkylene, etc.; and R6 represents hydrogen or C1-4 alkyl, provided that R1 and R3 in combination may form a ring. The compound comprises a group represented by the formula (1) and any of hyaluronic acid, a derivative thereof, and salts of these, the former being bonded to a hydroxyl group of the latter through a carbamate linkage.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年6月6日 (06.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/44218 A1(51) 国際特許分類:
31/728, A61P 19/02, 29/00 C08B 37/08, A61K

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10493

(22) 国際出願日: 2001年11月30日 (30.11.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-363993
2000年11月30日 (30.11.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP). 電気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒100-8455 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池谷仁志 (IKEYA, Hitoshi) [JP/JP]. 守川忠志 (MORIKAWA, Tadashi) [JP/JP]. 高橋浩一 (TAKAHASHI, Koichi) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 岡町

晃 (OKAMACHI, Akira) [JP/JP]. 田村達也 (TAMURA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

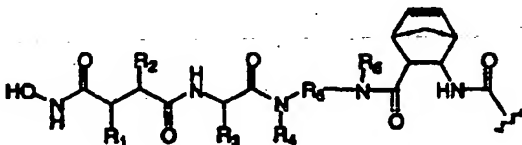
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOUND OF HYDROXAMIC ACID DERIVATIVE AND HYALURONIC ACID

(54) 発明の名称: ヒドロキサム酸誘導体とヒアルロン酸の結合体



(1)

represents hydrogen or C_{1-4} alkyl; R_5 represents $-R_7-R_8-R_9$, where R_7 represents C_{1-8} alkylene, R_8 represents methylene, imino, oxygen, etc., and R_9 represents C_{1-10} alkylene, etc.; and R_6 represents hydrogen or C_{1-4} alkyl, provided that R_1 and R_3 in combination may form a ring. The compound comprises a group represented by the formula (1) and any of hyaluronic acid, a derivative thereof, and salts of these, the former being bonded to a hydroxyl group of the latter through a carbamate linkage.

(57) Abstract: A compound having MMP inhibitory activity which is a compound of a hydroxamic acid derivative represented by the following general formula (1) and hyaluronic acid: (1) wherein R_1 represents hydrogen, hydroxy, C_{1-8} alkyl, etc.; R_2 represents C_{1-8} alkyl, etc.; R_3 represents C_{1-8} alkyl, etc.; R_4

[続葉有]

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日

2002年6月6日 (06.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 02/44218 A1

(51) 国際特許分類:
31/723, A61P 19/02, 29/00(21) 国際出願番号:
PCT/JP01/10493(22) 国際公開日:
2001年11月30日 (30.11.2001)(25) 国際出願の言語:
日本語(26) 国際公開の言語:
日本語(30) 優先権データ:
特願2000-363993
2000年11月30日 (30.11.2000) JP

(71) 出願人 (米国外国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区豊島5丁目5番1号 Tokyo (JP); 電気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO KAISHA) [JP/JP]; 〒100-8455 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号 Tokyo (JP).

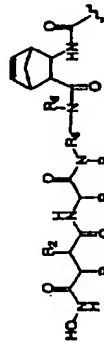
(72) 発明者: および
(73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池谷仁志 (IKEGA, Hitoshi) [JP/JP]; 守川忠志 (MORIKAWA, Tadashi) [JP/JP]; 高橋浩一 (TAKAHASHI, Koichi) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市相町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP); 関町添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各LC747セットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOUND OF HYDROXAMIC ACID DERIVATIVE AND HYALURONIC ACID

(54) 発明の名称: ヒドロキサン酸誘導体とヒアルロン酸の結合体

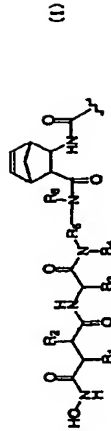
WO 02/44218 A1

(57) Abstract: A compound having MAP inhibitory activity which is a compound of a hydroxamic acid derivative represented by the following general formula (I) and hyaluronic acid: (I) wherein R₁ represents hydrogen, hydroxy, C₁₋₄ alkyl, etc.; R₂ represents C₁₋₄ alkyl, etc.; R₃ represents C₁₋₄ alkyl, etc.; R₄ represents hydrogen or C₁₋₄ alkyl, etc.; R₅ represents C₁₋₄ alkylene, R₆ represents methylene, imino, oxygen, etc., and R₆ represents C₁₋₄ alkylene, etc., and R₆ represents hydrogen or C₁₋₄ alkyl, provided that R₁ and R₂ in combination may form a ring. The compound comprises a group represented by the formula (I) and any of hyaluronic acid, a derivative thereof, and salts of these, the former being bonded to a hydroxyl group of the latter through a carbamate linkage.

[続表有り]

(57) 要約:

MMP阻害作用を有する、下記一般式(1)のヒドロキサン酸誘導体とヒアルロン酸の結合体:

(式中、R₁は、水素原子、水酸基、炭素数1~8のアルキル基、他を表し;R₂は、炭素数1~8のアルキル基、他を表し;R₃は、炭素数1~8のアルキル基、他を表し;R₄は、水素原子、または炭素数1~4のアルキル基を表し;R₅は、-R₇-R₈-R₉を表し、ここで、R₇は、炭素数1~8のアルキレン基を表し、R₈は、メチレン基、イミノ基、または酸素原子、他を表し、R₉は、炭素数1~10のアルキレン基、他を表す;R₆は、水素原子、または炭素数1~4のアルキル基を表す;また、R₁とR₂は環を形成してもよい。)

で表される基と、ヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩の水酸基とが、カーバメート結合している結合体。

明細書

ヒドロキサン酸誘導体とヒアルロン酸の結合体

5 技術分野

本発明は、マトリックスメタプロテアーゼ（以下MMPとも称す）阻害活性を有し、変形性関節症、慢性関節リウマチ等の関節疾患の治療に有用な、ヒドロキサン酸誘導体とヒアルロン酸との結合体に関する。

背景技術

10 関節軟骨は約70%の水分と、軟骨細胞および軟骨マトリックスとから構成されている。軟骨マトリックスを構成する主成分はコラーゲンとプロテオグリカンであり、網目構造を有するコラーゲンのネットワークに水分保持能に富むプロテオグリカンが含まれている。軟骨マトリックスは粘弾性に富み、軟骨にかかる刺激や負荷を軽減して、関節軟骨が正常な形態と機能を保持する上で重要な役割を果たしている。

15 変形性関節症（以下、OAとも称す）と慢性関節リウマチ（以下、RAとも称す）は、共に軟骨マトリックスの破壊を伴う代表的な疾患である。両疾患におけるマトリックスの破壊は、OAでは加齢に伴うメカニカルストレス、RAでは滑膜表層細胞の過剰増殖、パンスス形成、炎症性細胞の浸潤などが引き金となり、

20 いずれもプロテアーゼの誘導を介して惹起されるものと考えられている。軟骨マトリックスの分解が中性のpHを持つ細胞外で行われることから、この領域のpHを至適とするマトリックスメタプロテアーゼが分解の中心的な担い手と言われている[Current Opinion in Anti-Inflammatory & Immunomodulatory Investigational Drugs, vol.2, 16-25, (2000)]。

25 現在までに、MMPに属する酵素として20種類が報告されており、それらと結合して活性を阻害する組織メタプロテアーゼインヒビター（以下、TIMPとも称す）と呼ばれる生体内タンパク質も4種類が見いだされている[J.Biol.Chem., vol.274, 21491-21494, (1999)]。また、近年、分子内にメタプロテアーゼ様のドメインとデイスインテグリン様のドメインとを併せ持つ新たなMMP様タ

ンパク質（以下、ADAMまたはADAMTSとも称す）が少なくとも30種類以上見だされている。ADAMやADAMTSの内のいくつかは、例えば、ADAM17(TNF α 変換酵素)やADAMTS-4,-5（アグリカナゼI₁-II）などのように、MMP様のプロテアーゼ活性を持つことも明らかにされている[Current Opinion in Anti-Inflammatory & Immunomodulatory Investigational Drugs, vol.2, 16-25, (2000)]。

30 これら一連のMMPファミリーに属する酵素群は、生理的条件下では発生、血管新生、性周期、骨リモデリング、組織修復などさまざまな機能を担っている。これらの機能が適切に発現されるよう、酵素の産生、活性化および基質との相互作用の各段階はTIMP等の生体内インヒビターによって厳密にコントロールされている。換言すれば、病態でのマトリックスの破壊は、MMPの調節機構に何らかの破綻が生じ、MMPが過剰に産生、活性化されたことに起因すると考えられる。

15 それゆえ、MMPを阻害する薬物は、OAやRA等の関節疾患における軟骨マトリックスの破壊を抑制する薬物として極めて有望である。MMPを阻害する薬物はこれまでも数多く報告されている(Exp. Opin. Ther. Patents (1998) vol.1, 259-282, J. Enzyme Inhibition (1998) vol.13, 79-101, Drug Discovery Today (1996) vol.1, 16-26, Chem. Rev. (1999) vol.99, 2735-2776)が、阻害活性の強さとMMPへの特異性の高さから、マトリックスメタプロテアーゼ阻害剤（以下、MMP Iとも称す）としてはヒドロキサン酸誘導体が、現在、最も注目されている。既に経口投与でもMMP阻害作用を発揮するヒドロキサン酸誘導体が見いだされており、そのうちのいくつかは癌患者や関節疾患の患者を対象に、臨床試験が進められている。しかし、この種のMMP Iは、程度の差こそあれ、すべてのMMPに対する阻害作用を持ち、生理的な機能に関わるMMPをも抑制してしまう可能性がある。事実、癌患者を対象に進行中である、ヒドロキサン酸誘導体の臨床試験では、一過性ながら骨筋肉痛などの副作用が約30%の頻度で起こることが報告されている[Ann.NY Acad.Sci., vol.878, 228-235, (1999)]。

25 最近では、特定のMMPへの特異性を高めた改良品の開発も進められているが、未だ病態のみに関与するMMPは特定されておらず、また、統々と未知のMM

Pが発見されていることから、全身投与時にMMPの何らかの生理作用を抑制してしまう可能性も払拭されていない。

こうした問題を解消する試みとしては、まず、MMP Iの関節腔内への局所投与が考えられる。しかし、公知のヒドロキサン酸誘導体では、頻回の関節腔内注射が必要となり、OAやRA患者への長期の使用は極めて困難である。他の試みとしては、MMP Iを標的部位にのみ限局させる、いわゆるドラッグデリバリーシステムが考えられる。しかし、従来技術では投与されたMMP Iを罹患関節内に限局または貯留させる方法は確立されていない。

このように、MMP Iは優れた薬理作用を有しながらも、OAやRAのような慢性疾患の治療薬として臨床応用するためには、依然として解決すべき問題が存在する。

ところで、ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との繰り返し単位より構成される生体内ポリカルボン酸であり、関節液を構成する主成分として関節液の粘弾性、荷重吸収作用および潤滑作用の保持に重要な働きを果たしている。また、軟骨マトリックスにおいては、軟骨プロテオグリカンと結合してアグリカンと呼ばれる重合体を形成し、水分保持能と粘弾性の維持に中心的な役割を担っている。

現在、関節疾患、特にOAや肩関節周囲炎においては、HAおよびその架橋物（以下、臨床的に使用されているHAとその架橋物を総称してHA製剤とも称す）の関節内注入療法が臨床的に広く行われている。HAは細胞外マトリックスの構成成分であることから軟骨マトリックスにも高い親和性を有する。またそれ自身高い粘弾性を有していることから、関節内に注入された後、関節腔内に長時間局在する特徴を有している。

これまで関節腔内の貯留性を高めるため、ヒアルロン酸自体の物性を変化させるなどの試みが報告されている（特開平6-254381号公報、特開平11-130697号公報、WO99/10385号公報など）。しかし、HA製剤にはMMPを阻害する作用はないため、OAやRAの病態において進行する関節破壊を十分に止める効果は期待できない。

これまでに、HAと薬物の結合体が報告されている（特開平5-85942号

公報、WO92/06714号公報、特開昭62-64802号公報、特許第2701865号公報、WO99/59603号公報など）。これらは、HAの上述のような局所貯留性に着目し、薬物を局所に長時間貯留させ、特定部位での薬物の作用時間が延長されることを期待したものである。

特に、WO99/59603号公報には、ヒドロキサン酸残基とHAとの結合体が開示されており、その結合体がMMP阻害作用を有し関節疾患治療剤として使用し得ることが開示されている。該公報に具体的に開示されている結合体の、MMP阻害活性や安定性をさらに改善することは、非常に優れた結合体の創製につながる。

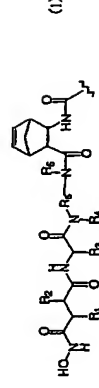
10 本発明の目的は、MMP阻害作用を有する、ヒドロキサン酸誘導体とヒアルロン酸の結合体を提供することである。

本発明の別の目的は、上記結合体を含み、MMP阻害作用を関節腔内または関節組織上に限局させうる関節疾患治療薬などとして有用な医薬を提供することである。

15 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、特定のヒドロキサン酸誘導体にヒアルロン酸誘導体を結合させた結合体が、これまで報告されてきた結合体よりも極めて優れたMMP阻害活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

20 即ち、本発明は、下記一般式（1）



（式中、

25 R₁は、水素原子、水酸基、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルコキシ基、または炭素数2～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルケニル基を表し；

R₂は、炭素数3～10のシクロアルキル基によってもしくは置換されていて
もよい炭素数6～14のアリール基によって置換されていてもよい炭素数1～8
の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表し；

R₃は、炭素数3～10のシクロアルキル基によってもしくは置換されていて
もよい炭素数6～14のアリール基によって置換されていてもよい炭素数1～8
の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表し；

R₄は、水素原子、または炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基
を表し；

R₅は、-R₇-R₈-R₉-を表し、ここで、

10 R₇は、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキレン基を表し、

R₈は、炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基で置換されていても
よいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し、

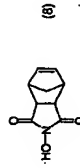
R₉は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もし
くは分枝鎖状のアルキレン基を表す；

15 R₆は、水素原子、または炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基
を表す；

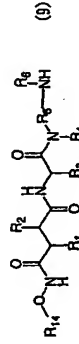
また、R₁とR₃は環を形成してもよい、

で表される基と、ヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩の
水酸基とが、カーバメート (carbamate) 結合により結合している結合
20 体を提供する。

また、本発明は、式 (8)



で表される化合物、カルボジイミド類、およびヒアルロン酸を反応させ、活性化
ヒアルロン酸を得る工程と；その活性化ヒアルロン酸と式 (9)



(式中、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅およびR₆は、上記一般式 (1) における定義
と同じであり、R₄は保護基を表す。) で表されるアミン化合物とを反応させる
工程と；得られた反応物のR₁₄を脱保護する工程と；を含む、上記の結合体を製
造する方法を提供する。

5 また、本発明は、上記の結合体を含む医薬を提供する。

なお、WO99/59603号公報には、ヒドロキサム酸残基がスベーサーを
介してHAと結合した結合体が開示されているが、本発明における結合体につい
ては具体的な開示はない。

発明の最も好ましい実施の形態

10 本発明における「ヒドロキサム酸誘導体」には、ヒドロキサム酸骨格 (N-ヒ
ドロキシアミド) を有する物質が含まれ、具体的には、例えば、前述の一般式 (1)
で表される基を有する化合物などが含まれる。

本発明において、一般式 (1) における置換基の非限定的具体例としては、特
示さない限り以下の内容を含む。

15 R₁の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基としては、メチル
基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチ
ル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘ
プチル基、n-オクタチル基などが挙げられるが、中でもメチル基が好ましい。

20 R₁の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルコキシ基としては、メト
キシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブト
キシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチルオキシ基、ヘキ
シルオキシ基、ヘプチルオキシ基、オクタチルオキシ基、イソペンチルオキシ基な
どが挙げられるが、中でもメトキシ基が好ましい。

25 R₁の、炭素数2～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルケニル基としては、ビニ
ル基、アリル基、n-ブテニル基、i-ブテニル基、sec-ブテニル基、ペン
テニル基、ヘキセニル基、ヘプテニル基、オクテニル基等が挙げられる。

R₁は上記のような定義を有するが、R₁としては水素原子、水酸基、メチル基
、およびメトキシ基が特に好ましい。

R₂の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基としては、メチル

基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基などが挙げられるが、中でもイソブチル基が好ましい。

- 5 R_2 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基の置換基としての炭素数3～10のシクロアルキル基としては、好ましくは炭素数5～7のシクロアルキル基が挙げられ、具体的にはシクロペンチル基、シクロヘキシル基、またはシクロヘプチル基等があげられる。

- 10 R_3 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基の置換基としての置換されていてもよい炭素数6～14のアリール基としては、水酸基、メトキシ基等の置換基を有していてもよい炭素数6～14のアリール基が挙げられ、具体的にはフェニル基、*p*-ヒドロキシフェニル基、*p*-メトキシフェニル基、またはナフチル基等が挙げられる。

R_3 は上記のような定義を有するが、 R_3 としてはイソブチル基が好ましい。

- 15 R_4 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基などが挙げられるが、中でも*t*-ブチル基が好ましい。

- 20 R_5 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基の置換基としての炭素数3～10のシクロアルキル基としては、好ましくは炭素数5～7のシクロアルキル基が挙げられ、具体的にはシクロペンチル基、シクロヘキシル基、またはシクロヘプチル基等があげられる。

- 25 R_6 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基の置換基としての置換されていてもよい炭素数6～14のアリール基としては、水酸基、メトキシ基等の置換基を有していてもよい炭素数6～14のアリール基が挙げられ、具体的にはフェニル基、*p*-ヒドロキシフェニル基、*p*-メトキシフェニル基、またはナフチル基等が挙げられる。

R_6 は上記のような定義を有するが、 R_6 としては*t*-ブチル基が好ましい。

R_7 が水素原子、水酸基、メチル基、またはメトキシ基である場合には、 R_8 が*t*-ブチル基であることが好ましい。

R_4 の炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基が挙げられ、中でもメチル基が好ましい。

- 5 R_4 としては、水素原子およびメチル基が好ましく、水素原子が特に好ましい。

R_5 の $-R_7-R_8-R_9-$ においては、 R_7 は NR_4 のNと結合し、 R_9 は NR_4 のNと結合している。

- 10 R_7 の炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキレン基としては、メチレン基、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、2-メチルペンタン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基などが挙げられる。

- 20 R_7 としては、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基が好ましい。

R_8 の炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基における置換基としての炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基が挙げられる。

- 25 R_8 としては、炭素数1～3の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基、及び酸素原子が好ましく、メチレン基、及び酸素原子が特に好ましい。

R_9 の1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もし

一般式 (1) で示される基は、式 (3) ~ (7) の基であることが好ましい (

一般式 (1) の光学異性体およびそれらの任意の割合の混合物等はいずれも本発明に包含される。

5 本発明において、「ヒアルロン酸 (HA)」とは、重量平均分子量 50, 000 ~ 10, 000, 000 を有する、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとから成る二糖の重合体、並びにこれらの混合物を挙げられる。HA は、粘弾性の強さの点から、重量平均分子量 700, 000 ~ 10, 000, 000 を有するものが好ましく、重量平均分子量 1, 000, 000 ~ 10, 000, 000 であることが特に好ましい。

10 本発明において「ヒアルロン酸誘導体」とは、ヒアルロン酸から誘導されるヒアルロン酸骨格を有する全ての物質を意味する。ヒアルロン酸誘導体の非限定的具体例としては、

(1) 糖成分であるグルクロン酸及び/または N-アセチルグルコサミンが還元末端を有しているヒアルロン酸誘導体；

(2) HA 中の 1 以上のカルボキシル基がエステル化されているヒアルロン酸誘導体 (例えば、ベンジルスルホン化 HA (Hyal, 登録商標, Fidia Advanced Biopolymers))；

(3) 重量平均分子量 50, 000 ~ 10, 000, 000 を有するグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとからなる二糖の重合体を、ホルムアルデヒドで架橋してさらに高分子化した誘導体 (例えば、シンビスク (Synvisc, 登録商標, バイオマトリックス))；並びに

(4) その他、HA 中の 1 以上の水酸基がアセチル化されているアセチル化 HA や、あるいは上記した HA または HA 誘導体に 1 以上の薬効成分、例えば制癌剤 (例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等が挙げられる)、免疫抑制剤、抗炎症剤 (ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤等が挙げられる)、抗リウマチ剤、抗菌剤 (β-ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、ポリペプチド系抗生物質、サルファ剤等が挙げられる) などを、スプレーを介

してまたは介さずに結合させることによって得られる誘導体等が含まれる。

HA または HA 誘導体の塩の非限定的具体例としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩などを挙げることができる。

HA の由来には特に制限されないが、例えば、連鎖球菌等のバクテリア、ヒト、ブタ、ニワトリ等に由来する HA を使用できる。

HA、HA 誘導体及びそれらの塩の非限定的具体例としては、例えば、スベニール (登録商標、日本セル)、アルツ (登録商標、科研製薬)、オベガン (登録商標、参天製薬)、ヒアルガン (登録商標、フィーディア)、オルトビスク (登録商標、アニセセラビューティックス)、ヒアロン (登録商標、ファルマシア&アプジョン) 等を挙げることでき、また、和光純薬工業 (株) 等の各種試薬メーカーのカタログに記載の HA、HA 誘導体及びこれらの塩を挙げることできる。

15 本発明の結合体においては、一般式 (1) で表される基と、HA もしくは HA 誘導体またはそれらの塩の N-アセチルグルコサミン (以下「GlcNAc」とも記す) の水酸基とが、カーバメート結合していることが好ましい。

また、一般式 (1) で表される基の、HA もしくは HA 誘導体またはそれらの塩中の GlcNAc 数に対する結合率が、0.01 ~ 50% であることが好ましく、0.1 ~ 10% であることが特に好ましい。ここで「結合率」とは、本発明の結合体を構成する HA もしくは HA 誘導体またはそれらの塩に含まれる全 GlcNAc 数に対する、その HA に結合した一般式 (1) で表される基の総数の割合をいう。こうした結合率は、例えば、後述の実施例 2 に記載の方法により算出できる。

本発明の結合体を医薬として適用する場合、薬学的に許容できる賦形剤または安定剤などと一緒に製剤化してから使用してもよい。

25 本発明の結合体を含む医薬の投与形態は特に限定されず、経口投与でも非経口投与でもよく、また、全身投与でも局所投与でもよい。一般的には、本発明の医薬は非経口的に局所投与するのが好ましく、例えば、注射剤として、関節内、静脈内、筋肉内または皮下に投与することができ、あるいはスプレー剤、局所用ク

リウム、ローション、または軟膏として経皮的に投与することができる。

本発明の結合物を含む医薬は、変形性関節症、慢性関節リウマチまたは肩関節周囲炎等の関節疾患治療薬としても使用できる。こうした医薬の製造に、好ましく関節疾患治療薬の製造に使用される。

5 薬学的に有効量の本発明の結合物を有効成分として含む医薬を、関節疾患等をもつ患者を治療するために投与することも好ましい。そうした場合、本発明の医薬の投与量は、患者の症状、年齢、性別などに応じて適宜選択できるが、注射剤として用いる場合は一般的には、有効成分である結合物の量として0.01mg/g/体重kg/日～100mg/体重kg/日、好ましくは0.1mg/体重kg/g/日～10mg/体重kg/日である。前記1日当たりの投与量の医薬を、1日に数回に分けて投与してもよく、1日1回投与してもよい。あるいは、2日～28日に1回投与してもよい。

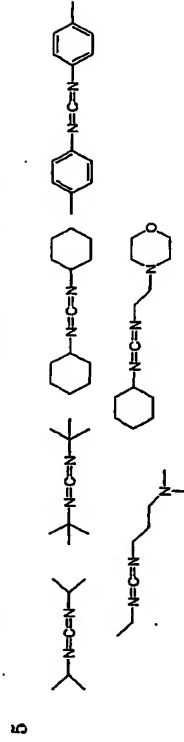
本発明の結合物の製造方法は、特に限定されないが、例えば、以下に示す方法等により、あるいは後述の合成実施例に示す方法により、またはそれを用いて製造することができる。

15 即ち、HAもしくはHA誘導体又はそれらの塩の水溶液にカルボジイミド類と式(8)で示される化合物を加え、塩酸やリン酸などの酸や緩衝液を用いて反応液のpHを4～6に維持しながら、0～35℃で1～96時間反応させる。反応液から透析などにより余分な低分子物質を除去し、活性化されたHAもしくはHA誘導体又はそれらの塩を得る。続いて、こうして得られた活性化されたHAもしくはHA誘導体又はそれらの塩の水溶液に、式(9)で示されるアミン化合物を加え、水酸化ナトリウムやトリエチルアミンなどの塩基を用いて反応液のpHを9～12に維持しながら、0～35℃で1～96時間反応させる。もし、ここで用いる式(9)で示されるアミン化合物の、水に対する溶解性が低い場合には、1～50%の有機溶媒(例えば、N、N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサン、エタノール、ピリジンなど)を含む水溶液を反応溶媒としてもよい。

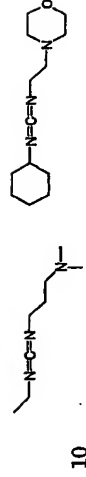
反応後、反応液にエタノール、アセトン等の有機溶媒を加え沈殿を生じさせ、沈殿物をアルコール沈殿、ゲルろ過、透析、イオン交換クロマトグラフィー等の

手段で精製することにより、目的とする結合物を得ることができる。なお、必要に応じて、この精製過程の前や途中にR₁₄を脱保護する操作(pH2～6の酸性下に暴露、または、接触還元)を加えてもよい。

なお、カルボジイミド類としては、例えば、下記化合物



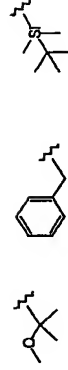
などが挙げられ、好ましくは



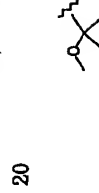
である。

式(9)におけるR₁、R₂、R₃、R₄、R₅およびR₆における置換基の非限定的具体例は、特に示さない限りは、上述した一般式(1)における置換基の非限定的具体例と同様である。

15 R₁₄ (保護基)としては、



などが挙げられ、好ましくは、



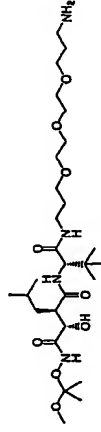
である。

以下、実施例および試験例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例および試験例になんら限定されるものではない。

実施例

(実施例1) ヒドロキサム酸誘導体の合成例

- 5 N'-(13-アミノノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-N-(3-S-ヒドロキシ-4-(N-(1-メトキシ-1-メチルエトキシ)アミノ)-2R-イソプロパシルサクシニル)-L-tert-ロイシンアミドの合成



10

- (a) N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-tert-ロイシンアミドの合成



15

- 1-アミノ-13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカン (7.9g)、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-tert-ロイシン (5.1g)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (3.4g)、ジクロロメタン (80ml) および N,N-ジメチルホルムアミド (20ml) の混合物に、-25℃にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (4.3g) およびトリエチルアミン (3.2ml) を加え、-25℃にて30分間、5℃にて1時間、さらに室温にて7時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、得られた残渣にジクロロメタンを加え、5%クエン酸水溶液、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下濃縮し得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶

15

出溶媒 ジクロロメタン：メタノール=100：3) を用いて精製し表題化合物 (8.2g) を得た。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (9H, s), 1.60 (9H, s), 1.50-1.65 (4H, m), 2.92-3.50 (16H, m), 3.76 (1H, d, J=9.6Hz), 5.00 (2H, s), 6.30 (1H, d, J=9.6Hz), 7.15-7.25 (1H, m), 7.25-7.40 (5H, m), 7.80-7.90 (1H, m).

(b) N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-L-tert-ロイシンアミドの製造

10



N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-tert-ロイシンアミド (4.2g)、トリフルオロ酢酸 (12ml) およびジクロロメタン (3ml) の混合物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出溶媒 ジクロロメタン：メタノール：アンモニア水=100：10：1) を用いて精製し表題化合物 (2.6g) を得た。

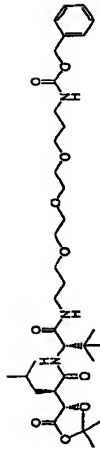
15

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.01 (9H, s), 1.65-1.80 (4H, m), 1.80-2.80 (2H, br), 3.10-3.65 (17H, m), 5.08 (2H, s), 5.65-5.80 (1H, m), 7.25-7.40 (5H, m), 7.50-7.65 (1H, m).

(c) N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-N-(2R-(2,2-ジメチル-4-オキソ-1,3-ジオキサラン-5S-イル)-4-メチルペンタノイル)-L-tert-ロイシンアミドの製造

25

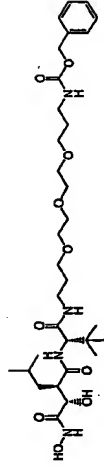
16



2R-(2,2-ジメチル-4-オキソ-1,3-ジオキソラン-5S-イル
5)-4-メチルペンタン酸 (1.80 g), N'-(13-ベンジルオキシカルボ
ニルアミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-L-tert-ロイシ
ンアミド (3.48 g), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (1.20 g
)、ジクロロメタン (28.8 ml) および N,N-ジメチルホルムアミド (7.
2 ml) の混合物に、-10℃にて EDC (1.50 g) および トリエチルアミ
ン (1.09 ml) を加え、-10℃にて 30 分間、0℃にて 1 時間、さらに室
温にて 16 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、得られた残渣に酢酸エチ
ルを加え、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。
減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (溶出溶媒
ジクロロメタン:メタノール=97:3) を用いて精製し、表題化合物 (4.9
15 0 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.81 (3H, d, J=6
3 Hz), 0.84 (3H, d, J=6.3 Hz), 0.90 (9H, s), 1.
40-1.64' (7H, m), 1.46 (3H, s), 1.56 (3H, s), 2.
94-3.10 (5H, m), 3.25-3.51 (12H, m), 4.23 (1
20 H, d, J=9.6 Hz), 4.42 (1H, d, J=8.7 Hz), 5.00 (2H, s), 7.19-7.24 (1H, m), 7.27-7.40 (5H, m),
7.81-7.87 (1H, m), 7.99-8.06 (1H, m).

(d) N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリ
オキサトリデカニル)-N-(3S-ヒドロキシ-4-(N-ヒドロキシアミノ
25)-2R-イソプロパルサクシニル)-L-tert-ロイシンアミドの製造



塩化ヒドロキシルアンモニウム (0.43 g) および 1N ナトリウムメトキシ
ド-メタノール溶液 (6 ml) の混合物を室温にて 2 時間攪拌した。反応混合物
5 から不溶物をろ別し、得られたろ液を N'-(13-ベンジルオキシカルボニル
アミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル)-N-(2R-(2,2-ジ
メチル-4-オキソ-1,3-ジオキソラン-5S-イル)-4-メチルペンタ
ノイル)-L-tert-ロイシンアミド (0.95 g) および メタノール (1
0 ml) の混合物に加え、室温にて 3 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し
10 、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (溶出溶媒 ジクロロメタ
ン:メタノール=10:1) を用いて精製し、表題化合物 (0.84 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.77 (3H, d, J=6
3 Hz), 0.80 (3H, d, J=6.3 Hz), 0.90 (9H, s), 1.
30-1.52 (3H, m), 1.54-1.68 (4H, m), 2.65-2.
73 (1H, m), 3.00-3.12 (4H, m), 3.24-3.52 (12
H, m), 3.70 (1H, t, J=8.3 Hz), 4.19 (1H, d, J=9
6 Hz), 5.00 (2H, s), 5.30 (1H, d, J=8.3 Hz), 7.
18-7.24 (1H, m), 7.26-7.39 (5H, m), 7.43-7.
20 49 (1H, m), 7.88-7.94 (1H, m), 8.86 (1H, d, J=
1.6 Hz), 10.55 (1H, d, J=1.6 Hz).

(e) N'-(13-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,7,10-トリ
オキサトリデカニル)-N-(3S-ヒドロキシ-4-(N-(1-メトキシ-
1-メチルエトキシ)アミノ)-2R-イソプロパルサクシニル)-L-tert
25 -ロイシンアミドの製造

3 S-ヒドロキシ-4- (N- (1-メトキシ-1-メチルエトキシ) アミノ)
 -2 R-イソプロピルサクシニル)-L-tert-ロイシンアミドの25 ml水溶液
 (20 ml) を添加した後、0.1N水酸化ナトリウム水溶液を添加して
 、4℃で22時間攪拌した。次いで、さらに0.1N水酸化ナトリウム水溶液を添加して
 5 pH10.9に調整し、4℃で1日間攪拌した。この溶液に塩化ナトリウム (8.4g) を添
 加した後、エタノール (500 ml) を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠
 心分離により上清と分離した。析出物を超純水 (360 ml) に溶解した後、塩化ナト
 リウム (14 g) を添加し、クリンベンチ内でボアサイズ0.45 μmのメンブランフ
 10 イルター (ミリポア製) でろ過し、エタノール900 mlを滴下してエタノール析出
 を行った。析出物を遠心分離により分離後、再び0.5M塩化ナトリウム溶液 (180
 ml) に溶解し、エタノール450 mlを滴下してエタノール析出を行った。析出物を
 遠心分離により分離し、生理食塩水 (大塚) 30mlに溶解し、表題化合物 (結合物
) の水溶液を得た。得られた結合物の分子量を、ヒアルロン酸を標準物質とする
 ゲルろ過法により求めたところ、約164万であった。結合物水溶液の濃度は18(w/
 15 v)であった。また、得られた結合物を塩酸加水分解して、結合物中のt-Leu量をア
 ミノ酸分析装置を用いて測定することにより、N' - (13-アミノ-4, 7,
 10-トリオキサトリデカニル) -N- (3S-ヒドロキシ-4- (N- (1-
 メトキシ-1-メチルエトキシ) アミノ) -2 R-イソプロピルサクシニル) -L
 -tert-ロイシンアミドの、ヒアルロン酸ナトリウム塩中のN-アセチルグ
 20 ルコサミンに対する結合率を算出したところ、3.8%であった。

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ 0.78 (d), 0.80 (d), 0.
 92 (s), 1.04-1.12 (m), 1.27-1.39 (m), 1.39-1
 .60 (m), 1.46-1.54 (m), 1.64 (br. s), 1.67-1.
 76 (m), 1.94 (br. s), 2.78-2.87 (m), 2.94 (br.
 25 s), 3.03-3.14 (m), 3.19 (m), 3.29 (br. s), 3.35
 (br. s), 3.45 (br. s), 3.48 (m), 3.59 (s), 3.61
 (s), 3.78 (br. s), 4.04 (d), 4.10 (s), 4.40 (br
 . s), 4.49 (br. s), 4.58 (br. s), 6.17 (br. s), 6
 .21 (br. s), 6.42 (br. s).

上記のNMRデータから、保護基が除去されていること、および結合物の構成
 成分が確認された。即ち、

(1) 保護基である1-メトキシ-1-メチルエチル基由来の1.30付近およ
 び3.22付近のシングレットシングナルは消失しているため、保護基は除去され
 5 ている。

(2) 3.29、3.45、3.78 ppmなどのヒアルロン酸由来のシングナル
 と、0.78、0.80、0.92、4.04、4.10 ppmなどのヒドロキ
 サム酸誘導体由来のシングナルに加えて、6.17、6.21、6.42 ppmの
 シングナルが観測された。これら6.17、6.21、6.42 ppmのシングナル
 10 は、HONBのオレフィン位由来のシングナルである。

(3) HONBのオレフィン位のシングナルは、元々等価で2プロトン分のシング
 レットシングナル (6.02 ppm) として観測されるが、ここでは2本のシング
 レットシングナル (6.17 ppmと6.42 ppmのペア、および6.21 ppmと
 6.42 ppmのペア) に割れている。この様に等価なプロトンが非等価に
 15 変化したことからHONBが開環した形で存在することが示唆された。

(実施例3) オリゴHA (不飽和二糖) とヒドロキサム酸誘導体との結合物
 の取得及び解析

実施例2で得られた結合物 (HAとヒドロキサム酸誘導体との結合物、以下「
 結合物A」とも記す) を、Streptococcus dysgalactiae由来のヒアルロニダーゼ
 (生化学工業社製、商品名「ヒアルロニダーゼSD」) を用いて、下記の条件で、
 オリゴHA (非結合物) と、オリゴHA (不飽和二糖) とヒドロキサム酸誘導体
 との結合物とに消化した。「ヒアルロニダーゼSD」は、HAのβ-N-アセチル-
 D-グルコサミニル(1→4)グルクロン酸結合を脱離反応的に切断して、非還元末端
 にΔ-4,5-グルクロン酸残基をもつ不飽和二糖を生成する酵素である。

25 [酵素消化条件]

40ml リン酸緩衝液 (pH6.0) 中。

結合物Aの濃度: HAとして0.48(w/v)。

ヒアルロニダーゼSD濃度: 0.5 U/ml (1UはpH6.2、37℃で1分間にHAから1 μ
 モルの不飽和二糖を遊離する酵素量である)。

37℃、20時間。

反応停止は、反応液を熱処理（100℃、5分間）することにより行った。得られた熱処理液をフィルタ―濾過（ポアサイズ0.45μmのメンブランフィルタ―、ミリポア製）して、濾液を回収した。得られた濾液を、以下の条件で逆相クロマトグラフィー（ラフィー）分画し、逆相カラムを素通りするオリゴHA（非結合体）を除去し、アセトニトリルグラジエントにより溶出されるオリゴHA（不飽和二糖）とヒドロキシサム酸誘導体との結合体の画分を集めた。

〔逆相クロマトグラフィー条件〕

使用装置：SMART System（ファルマシア社製）。

10 逆相カラム：μRPC C2/C18 PC3.2/3（ファルマシア社製）。

流速：200μl/分。

溶離液組成：0分～5分 水+0.1% TFA（トリフルオロ酢酸）。

5分～30分 0～50%アセトニトリル リニア グラジエント（0.1% TFA。）

15 サンプル：上記濾液 100μl/クロマトグラフィー。

検出：205nm。

分取回数：2回。

上記逆相クロマトグラフィーにおいて、15分付近で溶出した205nmのピーク部分をオリゴHA（不飽和二糖）とヒドロキシサム酸誘導体との結合体の画分として分取し、2回分を合わせて凍結乾燥した。

20 この凍結乾燥体を50%メタノールに溶解したものをサンプルとして、LC/MS分析を行った。LC/MS分析は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）とソニックスプレーイオン化法（SSI）によって、以下の条件で行った。

〔LC/MS条件〕

25 装置：日立社製 M-1200H。

サンプル導入：フローインジェクション法。

移動相：50%メタノール。

流速：50μl/分。

イオン化法：ESI（正イオンモード）。

ドリフト 30V、霧化器温度 250℃、細孔温度 120℃。

SSI（正イオンモード）。

窒素ガス流量 3L/分。

ESI法にて検出された質量は、 $m/z=1083$ であった。SSI法にて検出された質量は、 $m/z=1105$ であった。この結果と上述のNMRの測定結果から、酵素消化により生じたオリゴHA（不飽和二糖）とヒドロキシサム酸誘導体との結合体におけるH₂Oの開裂成分は、不飽和二糖のいずれかの水酸基部分と結合していることが確認された。ESI法では1個のナトリウムイオンが付加して正イオン化された質量であり、SSI法では1個のプロトンが脱離して2個のナトリウムイオンが付加して正イオン化された質量である。

10 （実施例4） N-アセチルグルコサミンとヒドロキシサム酸誘導体との結合体の取得及び解析

実施例2で得られた結合体Aを、ヒツジ睾丸由来のヒアルロニダーゼ（シグマ社製、Type V、HAのβ-N-アセチル-D-グルコサミン(1→4)グルクロン酸結合を加水分解して四糖及び六糖を生成する酵素）を用いて、以下の条件で、オリゴHA（非結合体）と、オリゴHAとヒドロキシサム酸誘導体との結合体とに消化した。

〔酵素消化条件〕

40mM リン酸緩衝液（pH6.0）中。

20 結合体Aの濃度：HAとして0.4%（w/v）。

ヒアルロニダーゼ濃度：10,000 U/ml（シグマ社表示活性）。

37℃、31時間。

反応停止は、反応液を熱処理（100℃、5分間）することにより行った。得られた熱処理液をフィルタ―濾過（ポアサイズ0.45μmのメンブランフィルタ―、ミリポア製）して、濾液を回収した。

25 この濾液250μlを、SEP-PAC C18カートリッジ（Waters社製）にかけ、5mlの水を通液することにより、素通りするオリゴHA（非結合体）を除去した。続いて20%アセトニトリル溶液5mlを通液し、溶出されるオリゴHAとヒドロキシサム酸誘導体との結合体の画分を得た。

得られた20%アセトニトリル溶出画分を凍結乾燥し、以下の更なる酵素分解に供した。

この凍結乾燥物全量を、ウシ肝臓由来のβ-グルクロニダーゼ（シグマ社製、type B-10、β-グルクロニドを加水分解してD-グルクロン酸を遊離させる反応を触媒する酵素で、オリゴ糖の非還元末端のD-グルクロン酸を遊離させる）を用いて、以下の条件で消化した。

〔酵素消化条件〕

20mM 酢酸緩衝液 (pH4.6) 中。

β-グルクロニダーゼ：20,000 U/ml（シグマ社表示活性）。

10 反応液量：400 μl。

37℃、21時間。

反応停止は、反応液を熱処理（100℃、5分間）することにより行った。得られた熱処理液をフィルター通過（ポアサイズ0.45 μmのメンブランフィルター、ミリア製）して、濾液を回収した。

15 さらに、この濾液に含まれているオリゴ糖とヒドロキシサマ酸誘導体との結合体を、Arthrobacter aureus由来のコンドロイチナーゼ（生化学工業社製、商品名「コンドロイチナーゼACIIアルスロ」、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸のβ-1,4-ヘキソサミニド結合を脱離分解し不飽和二糖を生成する酵素）を用いて、以下の条件でオリゴ糖（非結合体）と、N-アセチルグルコサミンとヒドロキシサマ酸誘導体との結合体とに消化した。

〔酵素消化条件〕

40mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 中。

コンドロイチナーゼACIIアルスロ：5 U/ml（生化学工業社表示活性）。

上記濾液：350 μl。

25 反応液量：400 μl。

37℃、20時間。

反応停止は、反応液を熱処理（100℃、5分間）することにより行った。得られた熱処理液をフィルター通過（ポアサイズ0.45 μmのメンブランフィルター、ミリア製）し、濾液を回収した。

得られた濾液を、以下の条件で逆相クロマトグラフィー分離し、逆相カラムを素通りするオリゴ糖等（非結合体）を除去し、アセトニトリルグラジエントにより溶出されるN-アセチルグルコサミンとヒドロキシサマ酸誘導体との結合体の画分を集めた。

5 〔逆相クロマトグラフィー条件〕

使用装置：SMART System（ファルマシア社製）。

逆相カラム：μRPC C2/C18 PC3.2/3（ファルマシア社製）。

流速：200 μl/分。

溶離液組成：0分～5分 水+0.1% TFA（トリフルオロ酢酸）。

10 5分～30分 0～50%アセトニトリル/ニアグラジエント（0.1% TFA）。

サンブル：上記濾液 100 μl/クロマトグラフィー。

検出：205nm。

分取回数：3回。

15 上記逆相クロマトグラフィーにおいて、16分付近に溶出した205nmのピーク部分をN-アセチルグルコサミンとヒドロキシサマ酸誘導体との結合体の画分として分取し、3回分合せて凍結乾燥した。

この凍結乾燥体を50%メタノールに溶解したものをサンブルとして、LC/MS分析を行った。LC/MS分析は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）とソニックスプレイイオン化法（SSI）によって、以下の条件で行った。

〔LC/MS条件〕

装置：日立社製 M-1200H。

サンブル導入：フローインジェクション法。

移動相：50%メタノール。

流速：50 μl/分。

イオン化法：

ESI（正イオンモード）：ドリフト 30V、霧化器温度 250℃、細孔温度 120℃

SSI（正イオンモード）：窒素ガス流量 3l/分。

ESI法およびSSI法ともに、検出された質量は、 $m/z=925$ であった。この結果から、酵素消化により生じたN-アセチルグルコサミンとヒドロキシサラム酸誘導体との結合体におけるHONBの構成成分は、N-アセチルグルコサミンの水酸基部分と結合していることがわかった。ESI法、SSI法ともに、1個のナトリウムイオンが付加して正イオン化された質量である。

(試験例1) MMP阻害活性

上述の実施例2に記載の方法により合成された結合体AのガラチナーゼAとストロメリン-1とに対する阻害活性を測定した。比較のため、WO99/59603実施例8記載の「結合体7」についても同様の測定を行った。ガラチナーゼAに対する阻害活性は、ロジュー・ダイアグノスティック社製のガラチナーゼ活性測定キットを用い、添付のプロトコルに従って、同社製のガラチナーゼA(1.2 U)を活性化後、37℃、1時間の酵素反応に対して測定した。また、ストロメリン-1に対する酵素阻害活性は、ヤガイ社製のストロメリン活性測定キットを用い、添付のプロトコルに従って、同社製の活性型ストロメリン-1(0.2 U)による37℃、3.5時間の酵素反応に対して測定した。

酵素阻害活性は、結合体Aおよび結合体7非添加時の各酵素活性を50%抑制するのに要する各結合体の濃度(IC_{50} , $\mu g/ml$ 、各結合体をヒアルロン酸として換算した濃度で表す)として表した。結果を表1に示した。結合体Aは、結合体7と比較して5~40倍のMMP阻害活性を有していた。

表1 マトリックスメタプロテアーゼ阻害活性

結合体	MMP阻害活性 (IC_{50} , $\mu g/ml$)	
	ガラチナーゼA	ストロメリン-1
結合体7	20	20
結合体A	0.5	4

(試験例2) ウサギ関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性

上述の実施例2に記載の方法により合成された結合体Aについて、Saltoらの方
法[J. Biochem., 122, 49-54(1997)]を改変した方法を用いて試験した。比較のため、WO99/59603の実施例8記載の「結合体7」についても同様の試験を行
った。

5-7週齢の雄性ウサギ由来の膝関節軟骨片(約10 mg)を、500 μL のDulbecco's modified eagle's Medium(DMEM)を添加した培養プレート上(Falco社製、4
穴平底培養プレート、#3078)で、37℃のCO₂インキュベーター中、24時間
培養した。培養液を0.2%のラクトアルブミンを含む500 μL のDMEMに交換後、結合
体Aまたは結合体7を添加し、インターローキン1(R&D社製、ヒトインター
ローキン-1 α 、#200-LA)(1 ng/ml)とヒトブラスミノゲン(Sigma社製、#P7397)(100 $\mu g/ml$)の存在下、37℃のCO₂インキュベーター
中で、更に10日間培養した(n=4~6)。培養終了後、培養上清と関節片残渣を
回収した。関節片残渣は、最終濃度4.5 mg/mlのパパイン(Sigma社製、#P
3375)で60℃、一夜消化した。培養上清とパパイン処理により得られた関節
片残渣の消化液とを試料とし、それぞれに最終濃度6Nになるように濃塩酸を添加
し、110℃のオートクレーブで2時間加水分解を行った。それぞれの試料にN₂ガス
を噴霧して乾燥させた後、5 mmol/LのEDTAを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液に溶解し
、各試料中のヒドロキシプロリン量を比色法(560 nm)にて測定した(Bio
rad社製、Benchmark Microplate Reader)。

関節片から培養上清中に遊離したヒドロキシプロリン量と関節片残渣中のハ
イドロキシプロリン量から、下記の式に従って、ヒドロキシプロリンの遊離率
を算出した。

$$\text{ヒドロキシプロリン遊離率 (\%)} = \frac{\text{培養上清中のヒドロキシプロリン量}}{\text{培養上清中のヒドロキシプロリン量} + \text{関節片残渣中のヒドロキシプロリン量}} \times 100$$

ウサギ関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性は、結合体Aあるいは結合体7非添加時のIL-1とプラスミニノーゲンによるハイドロキシプロリン遊離率を50%抑制する。のに要する各結合体の濃度 (IC₅₀, μg/ml、各結合体をヒアルロン酸として換算した濃度で表す) として表した。結果を表2に示した。結合体7に比べ、結合体Aは、約5倍の強さの関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性を有していた。

5

表3 ウサギ関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性

結合体	ウサギ関節コラーゲン 破壊阻害活性 (IC ₅₀ μg/ml)
結合体7	100
結合体A	20

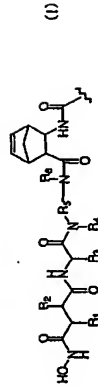
10 産業上の利用可能性

本発明の結合体は、優れたMMP阻害作用を有するとともに、作用の限局、長期化が可能である。本発明の結合体は、関節疾患治療薬とHAの両方の薬物としての有用性が改善された薬剤、例えば、関節破壊抑制作用が強化された薬剤として、優れた変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎の治療薬となることとが期待される。

15

請求の範囲

1. 下記一般式 (1)



5

(式中、

R₁は、水素原子、水酸基、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルコキシ基、または炭素数2～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルケニル基を表し；

10 R₂は、炭素数3～10のシクロアルキル基によってもしくは置換基を有していてもよい炭素数6～14のアリール基によって置換されていてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表し；

15 R₃は、炭素数3～10のシクロアルキル基によってもしくは置換基を有していてもよい炭素数6～14のアリール基によって置換されていてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表し；

R₄は、水素原子、または炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表し；

R₅は、-R₇-R₈-R₉-を表し、ここで、

R₇は、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキレン基を表し、

20 R₈は、炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し、

R₉は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキレン基を表す；

25 R₆は、水素原子、または炭素数1～4の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を表す；

また、R₁とR₃は環を形成してもよい。

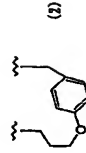
で表される基と、ヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩の

水酸基とが、カーバメート結合している結合体。

2. 一般式 (1) で表される基と、ヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩の構成成分であるN-アセチルグルコサミンの水酸基とが、カーバメート結合している請求の範囲第1項記載の結合体。

5 3. 一般式 (1) において、 R_2 がイソブチル基である請求の範囲第1または2項に記載の結合体。

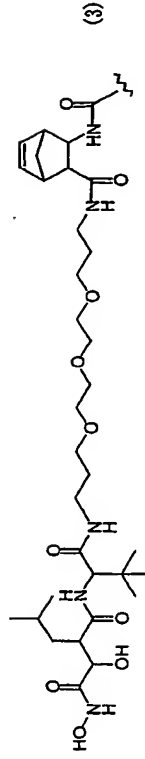
4. 一般式 (1) において、 R_1 が水素原子、水酸基、メチル基、またはメトキシ基であり、かつ R_3 が t -ブチル基であるか、あるいは R_1 と R_3 が一般式 (2)



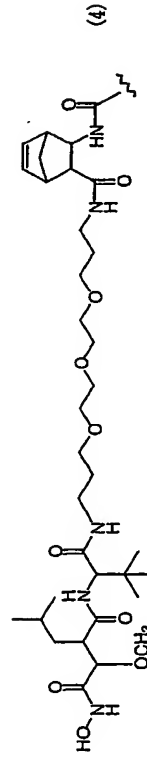
10

で表される環を形成する請求の範囲第1～3項のいずれか1項に記載の結合体。

5. 一般式 (1) で表される基が、下記の式 (3) ～ (7)

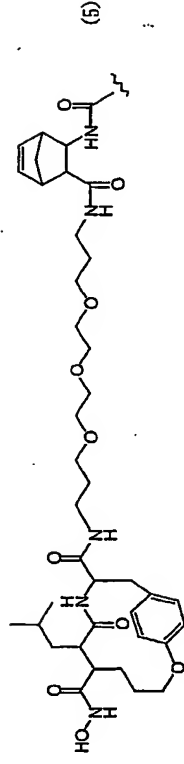


(3)

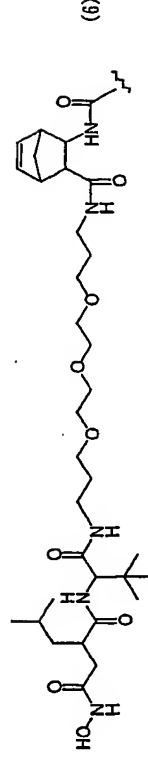


(4)

15

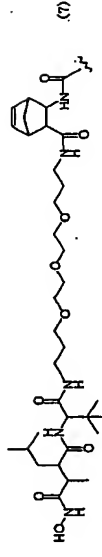


(5)



(6)

5



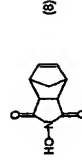
(7)

から選択される請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の結合体。

6. 一般式 (1) で表される基の、ヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩中のN-アセチルグルコサミン数に対する結合率が、0.01～50%である請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載の結合体。

10

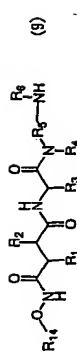
7. 式 (8)



(8)

で表される化合物、カルボジイミド類、およびヒアルロン酸を反応させ、活性化ヒアルロン酸を得る工程と；

15 その活性化ヒアルロン酸と式 (9)



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は、請求の範囲第1における定義と同じであり、 R_{14} は保護基を表す。)で表されるアミン化合物とを反応させる工程と；

得られた反応物の R_{14} を脱保護する工程と；

を含む、請求の範囲第1項記載の結合体を製造する方法。

8. 請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の結合体を含む医薬。

9. 関節疾患治療薬である請求の範囲第8項に記載の医薬。

10 10. 関節疾患が変形性関節症、慢性関節リウマチ、または肩関節周囲炎である請求の範囲第9項に記載の医薬。

11. 請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の結合体の、医薬を製造するための使用。

12. 請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の結合体の、関節疾患治療

薬を製造するための使用。

13. 関節疾患を有する患者を治療するための方法であって、薬学的に有効量の請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の結合体を有効成分として含む医薬を該患者に投与することを含む方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP01/10493	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ C08B37/08, A61K31/728, A61P19/02, 29/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. ⁷ C08B37/08, A61K31/728	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Relevant to claim No.
A	WO 99/59603 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 November, 1999 (25.11.1999), the whole document & EP 1082963 A
A	WO 00/46189 A (Shionogi & Co., Ltd.), 10 August, 2000 (10.08.2000), the whole document (family: none)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "B" earlier document but published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 05 February, 2002 (05.02.02)	
Date of mailing of the international search report 05 March, 2002 (05.03.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10493

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/10493

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08B37/08, A61K31/728, A61P19/02, 29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08B37/08, A61K31/728

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の

カテゴリー*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

請求の範囲の番号

関連する

カテゴリー

WO 99/59603 A (中外製薬株式会社) 1999. 1

1. 25 文献全体 & EP 1082963 A

A

WO 00/46189 A (塩野製薬株式会社) 2000. 0

8. 10 文献全体 (ファミリーなし)

A

1-12

1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に援拠を拠する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

「&」 同一パテントファミリー文献

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理窟の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.02.02

国際調査報告の発送日

05.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関3丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4P

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

第I欄 請求の範囲の一般の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1.3 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲13の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができ程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.